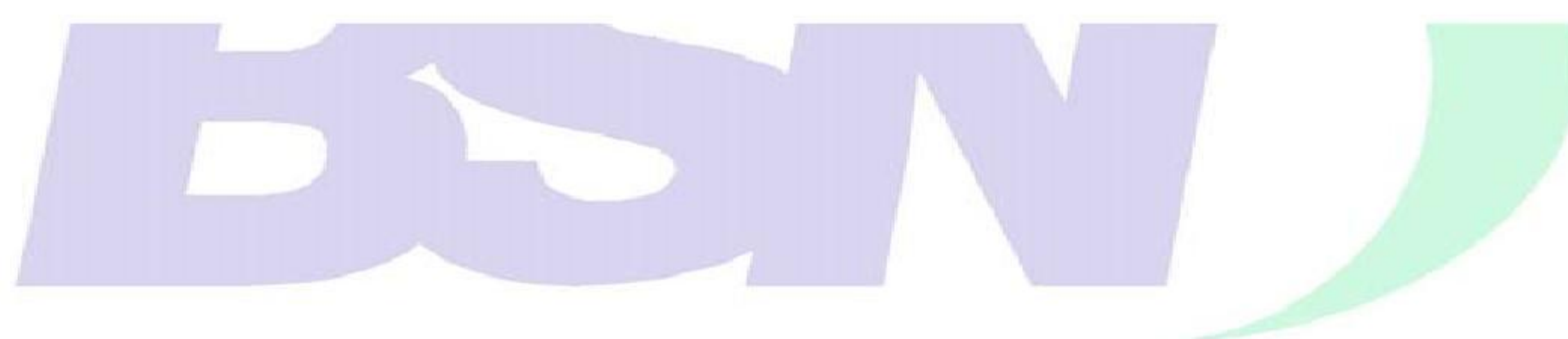


**Metode pengujian dengan kromatografi cair
kinerja tinggi (KCKT) - Bagian 4: Residu hormon
trenbolon dan dietilstibestrol dalam daging, jeroan
dan olahannya**



Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Bahan	1
5 Alat - alat.....	2
6 Prosedur	2
7 Interpretasi hasil	6
Bibliografi	7

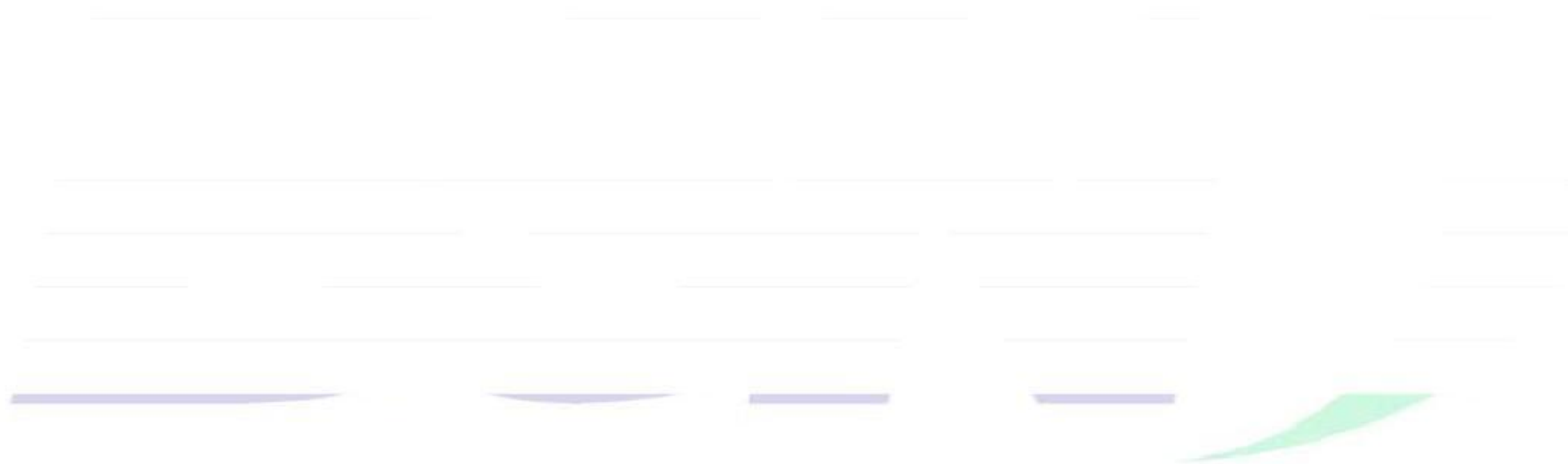


Prakata

Standar Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) - Bagian 4: Residu hormon trenbolon dan dietilstibestrol dalam daging, jeroan dan olahannya merupakan standar baru di Indonesia yang disesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi pada saat ini. Standar ini disusun dan dirumuskan setelah melalui validasi metode pengujian di beberapa laboratorium kesehatan masyarakat veteriner. SNI ini disusun untuk mendukung perundang-undangan Negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan.

Standar ini disusun dan dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode pengujian peternakan. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir pada rapat konsensus lingkup Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode pengujian peternakan pada tanggal 29 Juni 2009 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis dan pihak terkait lainnya.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 17 Desember 2009 sampai dengan 17 Februari 2010 dengan hasil akhir RASNI.



**Metode pengujian dengan kromatografi cair
kinerja tinggi (KCKT) - Bagian 4: Residu hormon trenbolon dan dietilstibestrol
dalam daging, jeroan dan olahannya**

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji residu hormon trenbolon dan dietilstibestrol dalam daging, jeroan dan olahannya secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan standar ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

residu

zat termasuk metabolitnya yang terkandung dalam daging, jeroan dan olahannya, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan hormon

2.2

daging

bagian otot skeletal dari karkas ternak/hewan yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

2.3

jeroan

bagian dari dalam tubuh hewan yang berasal dari ternak ruminansia yang disembelih secara halal dan benar serta dapat, layak, dan aman dikonsumsi oleh manusia kecuali yang telah diawetkan dengan cara lain daripada pendinginan

2.4

daging olahan

daging yang telah mengalami proses pengolahan

3 Prinsip

Residu hormon trenbolon dan dietilstibestrol dipisahkan dari matrik contoh, kemudian ikatan glukuronida dipecah menggunakan enzim *glucuronidase*, selanjutnya dimurnikan dan dianalisa pada KCKT dengan kolom fase terbalik yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 350 nm-365 nm.

4 Bahan

4.1 Standar pembanding

- a) *Trenbolone* dan/atau metabolitnya,
- b) *Diethylstibestrol* (DES).

4.2 Bahan kimia dan penunjang

- a) n-heksan,
- b) metanol p.a,
- c) metanol KCKT *grade*,
- d) dietileter,
- e) kloroform,
- f) asam asetat,
- g) natrium asetat/sodium asetat,
- h) asam karbonat,
- i) natrium karbonat/sodium karbonat,
- j) *aquabidest*,
- k) *enzyme β glucuronidase*,
- l) tris (*hydroxymethylaminomethane*),
- m) asam klorida,

5 Peralatan

- a) neraca analitik,
- b) gelas ukur (10 ml, 100 ml),
- c) labu Erlenmeyer (125 ml, 250 ml),
- d) labu ukur (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml),
- e) pipet volumetrik (1 ml, 2 ml, 4 ml, 5 ml, 8 ml, 10 ml, 20 ml),
- f) mikro pipet (50 μ l sampai dengan 200 μ l, 100 μ l sampai dengan 1000 μ l),
- g) pH meter,
- h) *refrigerator*,
- i) corong,
- j) *homogenizer ultraturax* atau *food processor*,
- k) *vortex mixer*,
- l) sentrifus,
- m) penangas air,
- n) unit penyaring vakum,
- o) alat penguap (*vacuum rotary evaporator* atau *nitrogen evaporator*),
- p) *ultrasonic bath*,
- q) satu unit KCKT dilengkapi dengan detektor UV-Vis,
- r) tabung reaksi 50 ml,
- s) labu evaporator,
- t) mini kolom (*cartridge*) *solid phase extraction (SPE)* fase terbalik C-18,
- u) kolom KCKT *reserved phase (RP)* fase terbalik C-18,
- v) filter *polytetrafluoroethylene* (PTFE) (0,45 μ m, 47 mm),
- w) siring berfilter (0,45 μ m, 13 mm),
- x) siring injeksi KCKT skala 10-50 μ l.

6 Prosedur

Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif (5 g contoh yang ditambah larutan standar dengan konsentrasi 10 μ g/ml sebanyak 75 μ l, sehingga dihasilkan konsentrasi akhir 0,15 μ g/g).

6.1 Pembuatan pereaksi/pelarut

6.1.1 Pembuatan larutan natrium asetat 0,04 M

Timbang natrium asetat sebanyak 3,28 g, dilarutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 1000 ml.

6.1.2 Pembuatan larutan asam asetat 0,04 M

Pipet sebanyak 2,28 ml asam asetat, kemudian larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 1000 ml.

6.1.3 Pembuatan larutan dapar asetat 0,04 M (pH 5,2)

Campur larutan 6.1.1 dengan larutan 6.1.2 dengan perbandingan 10 : 30 sehingga mencapai pH 5,2.

6.1.4 Pembuatan larutan natrium asetat 0,05 M

Timbang natrium asetat sebanyak 4,10 g, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 1000 ml.

6.1.5 Pembuatan larutan asam asetat 0,05 M

Pipet sebanyak 2,86 ml asam asetat, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 1000 ml.

6.1.6 Pembuatan larutan dapar asetat 0,05 M (pH 4,8)

Campur larutan 6.1.4 dengan larutan 6.1.5 dengan perbandingan 10 : 30, sehingga mencapai pH 4,8.

6.1.7 Pembuatan larutan asam karbonat 10 %

Timbang asam karbonat sebanyak 10 g, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 100 ml.

6.1.8 Pembuatan larutan natrium karbonat 10%

Timbang natrium karbonat sebanyak 10 g, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 100 ml.

6.1.9 Pembuatan larutan dapar karbonat (pH 10,25)

Campur larutan 6.1.7 dengan larutan 6.1.8 dengan perbandingan 10 : 50 sehingga mencapai pH 10,25.

6.1.10 Pembuatan larutan Tris 20 mM

Timbang Tris sebanyak 4,8 g, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 500 ml.

6.1.11 Pembuatan larutan asam klorida 0,1 N

Pipet sebanyak 0,31 ml asam klorida, larutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur dan tepatkan sampai 100 ml.

6.1.12 Pembuatan larutan dapar Tris 0,02 M

Masukkan larutan 6.1.10 sebanyak 50 ml dan larutan 6.1.11 sebanyak 9 ml ke dalam Erlenmeyer, tambahkan *aquabidest* hingga lebih kurang 200 ml dan tepatkan hingga mencapai pH 8,5.

6.1.13 Pembuatan larutan dapar Tris 0.02 M : metanol (80:20)

Campur larutan 6.1.12 dengan metanol dengan perbandingan 80 : 20.

6.1.14 Pembuatan larutan metanol 40 %

Pipet sebanyak 40 ml metanol, dilarutkan dengan *aquabidest* dalam gelas ukur dan tepatkan sampai 100 ml.

6.1.15 Pembuatan larutan fase gerak

Campur larutan *aquabidest* dengan larutan metanol KCKT *grade*, dengan perbandingan 20 : 80, kemudian saring dengan menggunakan filter PTFE (0,45 µm, 47 mm), lakukan sonifikasi dengan menggunakan *ultrasonic bath* untuk menghilangkan udara.

6.1.16 Pembuatan larutan standar campuran Trenbolon dan/atau metabolitnya dan DES

6.1.16.1 Larutan stok standar Trenbolon dan/atau metabolitnya dan DES dengan konsentrasi 1000 µg/ml

Timbang masing-masing 25 mg standar Trenbolon dan/atau metabolitnya dan DES, kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol KCKT *grade* dalam labu ukur serta tepatkan masing-masing sampai 25 ml.

6.1.16.2 Pembuatan larutan standar kerja

Pipet sebanyak 100 µl larutan 6.1.16.1 ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian tambahkan larutan 6.1.15, dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/ml.

6.1.16.3 Pembuatan larutan untuk kurva standar

- Pipet 2,5 ml larutan standar kerja 6.1.16.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan sampai volume 25 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 µg/ml.
- Pipet 500 µl larutan 6.1.16.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan volume sampai 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,05 µg/ml.
- Pipet 1 ml larutan 6.1.16.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 µg/ml.
- Pipet 2 ml larutan 6.1.16.3 a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 µg/ml.
- Pipet 400 µl larutan 6.1.16.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 µg/ml.
- Pipet 800 µl larutan 6.1.16.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.15 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,8 µg/ml.

6.2 Ekstraksi contoh

- Timbang 20 g contoh yang telah dihomogenkan dengan *homogenizer ultraturax* atau

- food processor*, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi 50 ml.
- b) Tambahkan 20 ml larutan 6.1.3.
 - c) Tambahkan 15 µl enzim *glucuronidase*.
 - d) Tambahkan 3 tetes kloroform.
 - e) Kocok dengan *vortex mixer* selama 2 kali 10 menit.
 - f) Inkubasi pada suhu 60 °C selama 180 menit.
 - g) Tambahkan 50 ml metanol.
 - h) Panaskan 90 °C, selama 10 menit.
 - i) Sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Pisahkan supernatan dari endapan, pindahkan ke dalam labu kocok.
 - j) Tambahkan 20 ml n-hexan kedalam larutan 6.2.i, kocok dengan hati-hati 3-5 kali, diamkan hingga kedua larutan terpisah dengan sempurna, lalu buang lapisan n-hexan .
 - k) Ulangi langkah 6.2.j.
 - l) Tambahkan 20 ml *aquabidest* kedalam larutan 6.2.k.
 - m) Tambahkan 30 ml dietileter kedalam larutan 6.2.l, kocok dengan hati-hati 3-5 kali, diamkan hingga kedua larutan terpisah dengan sempurna, lalu buang lapisan *aquabidest*.
 - n) Ulangi langkah 6.2.m.
 - o) Tambahkan 40 ml larutan 6.1.9 kedalam larutan 6.2.m dan tambahkan 40 ml *aquabidest*, kocok dengan hati-hati 3-5 kali, diamkan hingga kedua larutan terpisah dengan sempurna, lalu buang lapisan *aquabidest*.
 - p) Evaporasi lapisan dietileter dengan alat penguap (*vacuum rotary evaporator* atau *nitrogen evaporator*).
 - q) Tambahkan 3 ml larutan 6.1.6.

6.3 Pemurnian

6.3.1 Penyiapan/aktivasi mini kolom (*Cartridge*) C-18

- a) Alirkan 3 ml larutan 6.1.13 kedalam mini kolom SPE C-18 secara perlahan-lahan.
- b) Alirkan 2 ml larutan 6.1.14 kedalam mini kolom SPE C-18 secara perlahan-lahan, dan hindarkan terjadinya pembentukan gelembung udara di dalam mini kolom.

6.3.2 Proses pemurnian

- a) Alirkan contoh 6.2 q ke dalam mini kolom SPE C-18 yang sudah diaktivasi (6.3.1 b).
- b) Bilas mini kolom SPE C-18 dengan mengalirkan 3 ml larutan 6.1.13, dan 2 ml larutan 6.1.14, biarkan terbuang.
- c) Elusi mini kolom SPE C-18 dengan mengalirkan 1 ml metanol p.a, tampung eluat dalam labu evaporator/tabung.
- d) Keringkan dengan alat penguap (*vacuum rotary evaporator*) atau nitrogen evaporator, hingga hampir kering.
- e) Larutkan kembali ekstrak 6.3.2 d dengan 200 µl metanol KCKT *grade* kemudian saring dengan siring berfilter. Larutan siap diinjeksikan ke KCKT.

6.4 Penetapan dengan KCKT

6.4.1 Kondisi KCKT

- a) Kolom : fase terbalik (*reserved phase*, RP) (C-18, 30 cm x 3,9 mm).
- b) detektor : UV, panjang gelombang 350 nm-365 nm.
- c) fase gerak : larutan metanol dalam *aquabidest* sesuai dengan 6.1.15.
- d) kecepatan alir : 1 ml/menit.

6.4.2 Pembacaan hasil

- Injeksikan larutan 6.1.16.3 (volume lebih besar volume loop) secara berurutan ke KCKT dengan kondisi 6.4.1 hingga diperoleh kurva linier ($y = a + bx$).
- Injeksikan contoh 6.3.2 e (volume lebih besar volume loop).
- Apabila area yang dihasilkan dari contoh 6.4.2 b melebihi area kurva kalibrasi 6.4.2 a, maka ekstrak 6.3.2 e dapat diencerkan sampai diperoleh area dalam rentang kurva kalibrasi.

7 Interpretasi hasil

Kadar residu hormon dihitung menggunakan persamaan garis $y = a + bx$,

Keterangan :

y : area contoh;

a : *intersep*;

b : *slope*.

$$\text{Kadar residu } (\mu\text{g/g}) = \frac{X \times V_s}{B}$$

Keterangan :

X : Konsentrasi contoh hasil integrasi kurva ($\mu\text{g/ml}$);

Vs : Volume akhir sebelum injeksi (ml);

B : Berat contoh (g).

Bibliografi

Wozniak Barbara and Wojton Boleslaw, 1996. *Detection of The Metabolic Hormone Residues in The Urine and Muscles of Food Producing Animals By HPTLC with Aplication of Extraction Into A Solid Phase*, *Bulletin Veterinery Institut Pulawy*, Vol. 40, 55 – 59.













BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id